

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 59221955
PUBLICATION DATE : 13-12-84

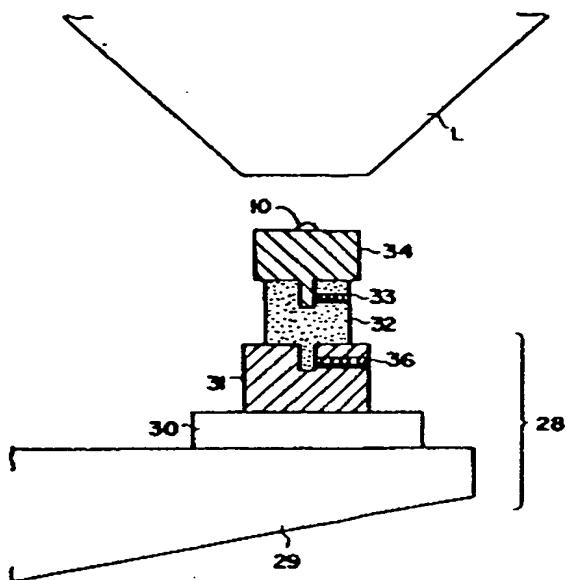
APPLICATION DATE : 31-05-83
APPLICATION NUMBER : 58096660

APPLICANT : INTERNATL PRECISION INC;

INVENTOR : KOIKE HIROTAMI;

INT.CL. : H01J 37/20 // G01N 23/225

TITLE : SPECIMEN OBSERVING METHOD
THROUGH QUICK CRYO-STAGE



ABSTRACT : PURPOSE: To enable at least minimum observation of cut face of a freezed specimen without requiring a preliminary exhaust chamber and stage cooling means by fixing a specimen and specimen table onto the cryo-stage of an electron beam system through an insulator then evacuating the specimen chamber and irradiating electron beam onto the specimen.

CONSTITUTION: A cryo-stage 28 is comprised of a base 29, X-Y moving system 30 and a rotary table 31. Refrigerated specimen 10 and specimen table 34 are fastened through a screw 33 to an insulator 32 fixed to the rotary table 31 through a screw 36. Teflon or other thermally non-conductive member is employed for the insulator 32. The specimen table 34 to be refrigerated by refrigerant together with the specimen 10 has high thermal capacity to maintain said specimen 10 under freezed state for sufficiently long interval during which the specimen 10 is observed. Consequently the cryo-stage 28 is not required to be coupled with any cooling means resulting in simplification of the structure of the cryo-stage 28.

COPYRIGHT: (C)1984,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭59—221955

③ Int. Cl.³
H 01 J 37/20
II G 01 N 23/225

識別記号

厅内整理番号
7129—5C
2122—2G

④ 公開 昭和59年(1984)12月13日
発明の数 3
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑤ 迅速クライオステージによる試料観察方法

⑥ 発明者 小池紘民

東京都西多摩郡羽村町羽2741—
7

⑦ 特願 昭58—96660

⑧ 出願 昭58(1983)5月31日

⑨ 発明者 井上貴央
八王子市暁町1丁目29番19号

米子市河崎3315—89

⑩ 代理人 弁理士 土橋皓

明細書の添付(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

迅速クライオステージによる試料観察方法

2. 特許請求の範囲

- 1) 試料を切り出して試料台上に設置し、試料及び試料台を冷媒内に浸漬して凍結させ、凍結せしめられた試料を冷媒内において割断し、上記試料及び試料台を電子線装置のクライオスステージ上に断熱材の介在の下に取付け、試料に電子線を照射することを特徴とする迅速クライオスステージによる試料観察方法。

- 2) 試料台は、試料を充分に長時間冷凍状態に保持する程度に大きな熱容量を有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の迅速クライオスステージによる試料観察方法。

- 3) 試料を切り出して試料台上に設置し、試料及び試料台を冷媒内に設置して凍結させ、凍結せしめられた試料を冷媒内において割断し、

試料及び試料台を予備排気室内に挿入し、この予備排気室内を真空排気し、予備排気室内で試料を蒸着処理し、また一方、上記操作手順と並行して電子線装置の試料室内を真空排気し、試料及び試料台を試料室内のクライオスステージ上に断熱材の介在の下に取付け、且つ試料に電子線を照射することを特徴とする迅速クライオスステージによる試料観察方法。

- 4) 予備排気室内又は試料室内における真空度は調節可能であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の迅速クライオスステージによる試料観察方法。
- 5) 試料を切り出して試料台上に設置し、試料及び試料台を冷媒内に設置して凍結させ、上記試料及び試料台を電子線装置の試料室内のクライオスステージ上に断熱材の介在の下に取付け、凍結せしめられた試料を試料室内において割断し、

特開昭59-221955(2)

上記試料室内を真空排気し、
試料に電子線を照射することを特徴とする迅速クライオステージによる試料観察方法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は、試料を凍結した状態で電子顕微鏡で観察する方法に係り、特に観察手順が単純でかつ高分解能高倍率での観察が可能を電子顕微鏡装置における試料の観察方法に係る。

生体試料を例えば走査電子顕微鏡(SEM)で観察する場合には、化学固定によって発生する変形を避けるため、試料を超低温で瞬間に凍結し、試料の形態と内容物とを同時に固定して観察する方法が用いられる場合がある。

この試料を凍結して観察する方法としては例えば第1図に示すよう、対物レンズの直下に設けられた冷却ゴニオステージ1(以下、迅速クライオスステージといふ)を備えた鏡体2に冷却ステージ3と冷却ナイフ4と蒸浴源5と給取り用のヒータ(図示していない)等を備えた予偏排気室6をエアーロツク弁7を介して接続し

た装置を用いて行なわれている。この装置において、迅速クライオスステージ1は鏡体外部に設けられた液体窒素8と熱的に接続されているが、この接続は、迅速クライオスステージ1の移動を確保するためと、液体窒素8の沸騰による振動クライオスステージ1へ伝達しないため鋼製の網が用いられている。予偏排気室6内の冷却ステージ3と冷却ナイフ4も予偏排気室6外に設けられた液体窒素9と熱的に接続されており、低温に冷却されている。

この装置を用いて試料を凍結して、観察を行なう方法は次の過程をもつて行なわれる。

- (1) 鏡体に冷却ゴニオスステージ1と、冷却ステージ3及び冷却ナイフ4等が設けられた予偏排気室6設置し、冷却ゴニオスステージ1、冷却ステージ3を冷却する。
- (2) 鏡体2内を真空ポンプで排気する。
- (3) 試料10を取り出す。
- (4) 試料10を試料台11に取り付ける。
- (5) 液体窒素等の冷媒で試料を凍結する。

- (6) 試料台11を転送格(図示していない)に取り付ける。
- (7) 予偏排気室6内の冷却ステージ3上に試料台11を転送格でマウントし予偏排気室6を密封する。
- (8) 予偏排気室6を真空ポンプで排気する。
- (9) 冷却ナイフ4を用いて試料10を切断する。
- (10) ナイフアッパ防止用の蒸浴処理を行なう。
- (11) 冷却ゴニオスステージ1を所定位置に調節する。
- (12) 予偏排気室6と鏡体2との間のエアロツク弁7を開ける。
- (13) 試料10を試料台11と共に転送格で冷却ゴニオスステージ1上に設置する。
- (14) 予偏排気室6と鏡体2との間のエアロツク弁8を開ける。
- (15) 試料10の観察を行なう。
また試料を交換して新たな試料の観察を行なうには、次の過程を行なう。
- (16) 予偏排気室6と鏡体2との間のエアロツク弁8を開く。

- (17) 試料10を試料台11と共に転送格で予偏排気室6内に移動する。

- (18) 予偏排気室6と鏡体2との間のエアロツク弁8を開じる。

- (19) 予偏排気室6に外気を導入して、転送格で試料10を試料台11と共に取り出す。

更に上記(2)～(18)を繰り反すものである。

またすべての試料の観察を終了した後には、上記(9)～(18)の操作を行ない、鏡体2から冷去ゴニオスステージ1と、冷却ステージ3及び冷却ナイフ4等が設けられた予偏排気室6を取り外すことよつて終了する。

以上のように、従来の電子顕微鏡における試料の観察方法にあつては、試料を観察するまでには、多くの過程を経なければならず煩雑なものであるし、一つの試料の観察が終了して、他の試料の観察を行なうまでには、多くの過程と長い時間とを要した。それは、観察を終つた試料を取り出す際には、(即ちの過程)予偏排気室6内に外気を導入して大気圧とするため漏防

特開昭59-221955(3)

止のため冷却ナイフ4及び冷却ステージ3をその度に室温にする必要があるためである。

また一般に試料を凍結して観察する程度は数%程度であるから、その程度、冷却ゴニオステージ1や予備排気室6を鏡体に組み付け、真空チャンク等を行なわなければならずその操作は観察のための操作のうち大きな過程をしめるものとなり煩雑なものであつた。

また、上記試料の凍結及び観察を行なう方法に使用される装置にあつては、冷却ゴニオステージ1と冷却ステージ3及び冷却ナイフ4の双方を冷却するため液体窒素の容器(デュワー)を2体設ける必要があり、また観察2と予備排気室6に独立して真空ポンプ系を必要とするため装置が複雑で高価なものとなるという不具合があつた。

更に液体窒素8と冷却ゴニオステージ1との熱的連絡は、冷却ゴニオステージ1の作動の確保と、液体窒素8の沸騰による泡立ちで発生する振動を冷却ゴニオステージ1に伝えないと、

鏡の金網で行なわれるが、熱伝導を効率良く行なうため金網の断面積が大きくなり、冷却ゴニオステージ1の移動は制限されるし、振動は完全には遮断されることはなく、高解像、高倍率での観察を行なうこととは困難であるという不具合があつた。

この発明は以上のような不具合に鑑みなされたものであつて、試料の凍結観察に必要な手順が少なく、必要とする装置が簡易で、かつ高解像高倍率での試料の観察ができる電子顕微鏡の観察方法を提供することを目的とする。

上記目的を達成するために、本発明者は、先ず上記従来例における問題が起る原因を追及してみた。そして、かかる原因是、従来のようないくつかの試料観察方法を実施するに当つて使用する必要がある装置が、電子顕微鏡に取付ける付属部品としてはあまりにも大型化され過ぎ、且つ複雑な機構を有していたことによるものであることを突止めた。特に従来において凍結試料を観察するためには、通常使用されているゴニオメー

クステージに代えて冷却用のクライオステージに取換える必要があり、しかもこのクライオステージに液体窒素を使用した冷却器が接続される。しかも鏡体2には予備排気室6を接続すると共に、この予備排気室6内にも液体窒素を使用した冷却器が接続された冷却ステージ3が取付けられている。このため、凍結試料の観察時には各冷却器の迴転等による振動がクライオステージ等に伝わり、試料の観察を困難にしていたのである。

ところで、上記の如くクライオステージや冷却ステージに冷却器を接続しなければならぬ必要性について検討する。クライオステージに冷却器を接続するのは、凍結試料を観察している間に当該凍結試料とステージとの間で熱伝導が行われ試料の凍結が緩む恐れがあり、これを防止すべく、試料観察中は冷却し続ける必要があるからである。次に予備排気室内の冷却ステージにも冷却器を接続するのは、従来では予備排気室内で、試料観察のための前処理、とりわ

け試料の切断を行つていたことによる。つまり、試料は冷媒内で凍結された後、この予備排気室内に移され、真空の雰囲気の下で切断されるが、この試料切断のために少からず作業時間が必要であり、その間に試料の凍結が緩む恐れがあり、これを防止すべく、試料の前処理中は冷却し続ける必要があるからである。特に上記前処理の中には、試料の切断の他に煮着処理等が含まれ、これらの作業に要するトータル時間を考慮すると試料を冷却し続ける必要がある。そしてまた、予備排気室内で、真空の雰囲気の下で試料の切断等を行うのは、冷媒内で断熱油まで冷却された試料を大気中に晒したままにしておくと、試料表面に霜が付着するというやつかいを問題があるため、従来ではこの霜の付着防止を最大の課題とし、試料を冷媒内から予備排気室内へ素早く移し、ここで前処理を行い、或体即ち試料室へ置くという手順によつていたのである。

本発明者は、上記従来方法における手順の各

特開昭59-221955(4)

々を検討し且つこれに用いられる装置構成について見直しを行つた結果次の様を結論に達した。

先ず試体内に配設されたクライオスステージは、試料の凍結状態を保持しつつ試料の移動、傾斜を行わせることが役目であるから、試料への熱伝導を遮断してやれば冷却器を接続しなくても凍結状態は充分に保持できるはずである。次に、試料の切断は予備排気室内で行う必要はなく、基本的には予備排気室は取扱つてしまつても構支えない。もし予備排気室を使うとしても、当該予備排気室内では試料への蒸着処理程度の作業のみを行い、予備排気室での前処理時間を大幅に短縮すべきである。こうすれば、上記試体内的クライオスステージにおけると同様、試料への熱伝導を遮断してやれば、冷却器を接続しなくとも予備排気室内で試料の凍結状態は充分保持できるはずである。

かかる点に基づいて、本発明では凍結試料の観察方法を従来とは大幅に変更した。

以下、本発明の構成を詳細に述べる。

回転台31にねじ36止めされた断熱材32に更にねじ33によつて締結される。断熱材32にはテフロン、その他の熱不良導体が用いられる。また、試料10と共に冷媒内で冷凍される試料台34は、少なくとも試料10を観察する時は、当該試料10を充分に長い時間冷凍状態に保ち得る様、大きな熱容量を持つ。このため、試料10と試料台34とは、断熱材32の介在によつてクライオスステージ28から熱的に切離され、当該クライオスステージ28からの熱伝導を受けることなく、試料台34の熱容量に応じて長時間かけて徐々に温度が上昇する。しかし、試料台34は充分に大きな熱容量を持つから、凍結試料が融けり過ぎて破壊不可能になることはない。このため、クライオスステージ28には何ら冷却手段を接続する必要なく、当該クライオスステージ28の構成を簡単にすることができる。そればかりか、クライオスステージ28には第3図に示すような通常の試料10a観察を行う場合の試料ステージ（即ち、ゴニオメータステージ）をそのまま使うという、いわ

ゆる共用化ができるため、わざわざ凍結試料観察用のステージを用意して観察方法を変える度にステージを取換える必要がない。これによりコストの低減と操作手順の簡易化を図ることができる。また、凍結せしめられた試料10の切断は、冷媒の中で行うから、鏡体2に予備排気室及びこれに接続すべき冷却手段を取り付ける必要はない。しかも、この試料10の切断過程において、試料が大気に出されて霜が付着する恐れはなく、次の段階では試料10は直接鏡体2内へ移されるから、この移送中における霜の付着は従来における場合と同程度に抑えることができる。よつて、かかる試料観察方法によれば、試料の前処理（特に切断処理）及び観察を行うためのステージを推進的に冷却する必要なく、装置の構造を簡単にすると共に装置の取付、取外しに要する操作手順を省略できるという利点がある。

本発明第2の発明に係る試料観察方法は、上記第1の発明と同様、試料10を冷媒内に没入した

特開昭50-221955(5)

状態で切断した後、凍結試料 10 及び試料台 34 を予備排気室内に挿入する段階と、この予備排気室内を真空排気する段階と、予備排気室内で試料 10 に蒸着処理を施す段階と、上記各段階での操作とは並行して電子線装置の試料室内を真空排気する段階と、試料 10 及び試料台 34 を試料室内のクライオスステージ上に断熱材の介在の下に取付け、更に試料 10 に電子線を照射する段階とを有して成る。かかる方法を実施するためのクライオスステージ及びその周辺部材が第 4 図及び第 5 図に示してある。この図において用いられるクライオスステージ 40 は、電子線装置の電子線軸に対して直角方向から試料の出し入れを行う、いわゆるサイドエントリータイプのゴニオステージから構成される。このクライオスステージ 40 は、電子線装置の隔壁から外方へ突出して伸びた臂状体 51 内に回転及びスラスト運動可能に取付けられた保持棒 43 と、ホルダ 44 と、電子線装置の隔壁に取付けられ且つ試料移動用のアーム 42 を有する試料移動機構 41 とから成る。臂

状体 51 の内部に仕子偏排気室 45 が形成されると共に、エアロフク弁 46 によって試料室 52 から隔離されている。またこの子偏排気室 45、試料室 52 内には蒸着源 48、49 がそれぞれ設置されている。なお図中、符号 47 及び 50 は予備排気室 45 及び試料室 52 を真空排気するための排気管である。かかる構成を有するクライオスステージ 40 上に冷凍された試料 10 及び試料台 34 を載置するには、保持棒 43 をホルダ 44 と臂状体 51 から引抜き、ホルダ 44 上の所定の場所に試料 10 を載せた試料台 34 を装填した後、再度保持棒 43 を臂状体 51 先端から電子線装置 50 内へ挿入して行う。ホルダ 44 は断熱材 53 を介して保持棒 43 に固定され、また断熱材 54 を介して試料移動アーム 42 に連結されるようになつてある。断熱材 53、54 には上記第 1 の発明におけると同様、例えばテフロン、その他の樹脂といつた熱不良導体が用いられる。また試料台 34 は、試料 10 を充分に長い時間冷凍状態に保ち得る様、大きな熱容量を持つ。このため、試料 10 と試料台 34 とは断熱材 53、54 の介

在によつてクライオスステージ 40 から熱的に切離される。

かかる装置において、凍結せしめられた試料 10 は冷媒の中で切断されホルダ 44 上に載せられて先ず子偏排気室 45 内へに入る。そして、この子偏排気室 45 と試料室 52 との間をエアロフクした後子偏排気室 45 内を真空排気し、試料 10 への蒸着を行う。そして、この蒸着処理が終了した後、試料 10 は試料室 52 内へと挿入され、所定の位置にセットされて試料観察が行われる。試料 10 及び試料台 34 はクライオスステージから熱的に切離されているから、試料 10 は、試料台 34 の熱容量に応じて徐々に温度が上昇する。また試料台 34 は充分に大きな熱容量を持つから、凍結試料が最も過度で観察不可能になることはない。又つて、クライオスステージ 40 には何ら冷却手段を接続する必要はなく、当該クライオスステージ 40 の構成を簡単にすることができる。また子偏排気室 45 についてみても、この子偏排気室 45 内では、従来における如く試料 10 の切断を行わない

ため、この子偏排気室 45 内での前処理時間は大幅に短縮される。したがつて、試料 10 が子偏排気室 45 内で処理されている間に当該試料 10 を純粋的に冷却する手段は不要となり、コストの低減及び該室 45 内での振動の発生防止を図り得る上、操作手順の簡素化を図り得るという利点がある。

次に、本願第 3 の発明に係る試料観察方法は、試料 10 を試料台 34 と共に冷媒の中で凍結させる点については上記第 1 の発明及び第 2 の発明と同様であるが、上記操作段階に引説いて、試料 10 及び試料台 34 を電子線装置のクライオスステージ上に断熱材の介在の下に取付ける段階と、凍結せしめられた試料を試料室内において切断する段階と、試料室内を真空排気すると共に試料に電子線を照射する段階とから成つてゐる。即ち、試料 10 及び試料台 34 は冷媒内にて冷凍された後、第 6 図に示すように直ちに試料室内のクライオスステージ 28 上に断熱材 32 の介在の下に取付けられ、その後試料 10 はナイフ 35 等の道具によつて切断され、第 7 図に示すようになる。左

特開昭59-221955(6)

お、同図中のクライオスステージ 28は第2図に示されたものと同じ構成を有するから説明を省略する。また断熱材 32の材質、試料台 34の特性等についても、上記断熱材、試料台と同じである。

しががつて、この第3の発明においても、上記第1の発明におけるとほぼ同様、試料 10及び試料台 34はクライオスステージ 28からは熱的に切離され、当該クライオスステージ 28の影響を受けることとけないので、冷却手段は不要となる。また、通常観察用の試料ステージを凍結試料観察用にも共用できるから装置の有効利用が図られる。更にまた、凍結せしめられた試料 10は試料室内で切断されるから、予留排気室及びこれに接続すべき冷却手段を取付ける必要はない。よってかかる試料観察方法によれば、試料の切断等の前処理及び観察を行うに際して、ステージを常に冷却し続ける必要がなく、装置の構造を簡単にすると共に操作をより簡易化することできるという利点がある。

以上説明したように、本願発明によれば、冷

却手段を使用しなくても凍結試料に対する前処理を行なうことが出来、しかも試料観察を行なうことが出来るようになつた。このため、凍結試料の観察に用いる装置の構造をより一層簡単に出来る上、同じステージを通常試料観察と凍結試料観察とに共用できるという利点が得られる。さらに、装置の簡単化に伴い、凍結試料の観察時における操作手順が大幅に簡便され、観察作業のスピードアップを図り得ると共に、余計な器材による振動発生がなくなつたため、極めて高品質の試料観察像が得られるという所期以上の効果を発することができた。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、従来の凍結試料の観察に用いられるクライオスステージの構成を概略的に示す図、第2図は本願第1発明の実施に用いられるクライオスステージを示す図、第3図は上記クライオスステージを通常試料の観察に用いる状態を示す図、第4図は本願第2発明の実施に用いられるクライオスステージを示す図、第5図は第4図のク

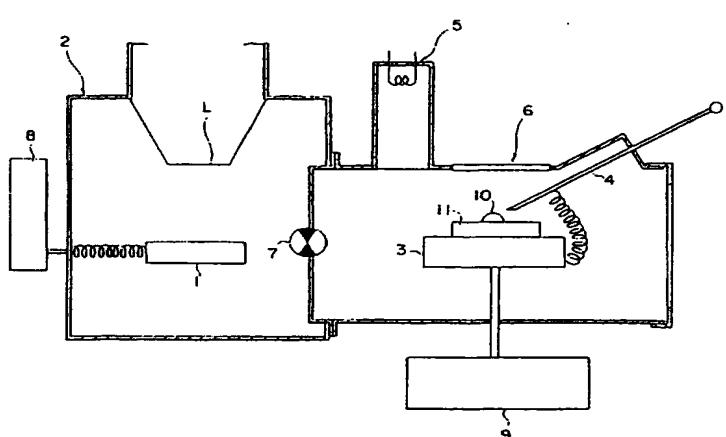
ライオスステージにおける試料設置を拡大して示す同図中V-V線における断面図、第6図は本願第3の発明の実施に用いられるクライオスステージ及び実施の模様を示す図、第7図は第6図において試料の切断を行つた後の試料及び試料台の構成を示す断面図である。

1 . 28 , 30… (迅速) クライオスステージ	
2 … 総体	3 … 冷却ステージ
10 , 10a … 試料	32 , 53 , 54 … 断熱材
34 … 試料台	45 … 予留排気室
48 , 49 … 削道鏡	52 … 試料室
B … 電子顕微鏡	L … 対物レンズ

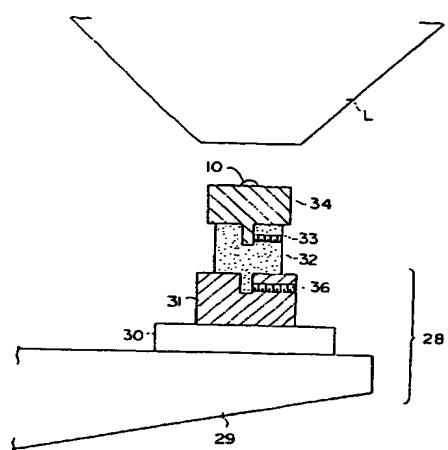
特許出願人 株式会社 国際精工
代理人弁理士 土橋 勝

図面の添付(内容に変更なし)

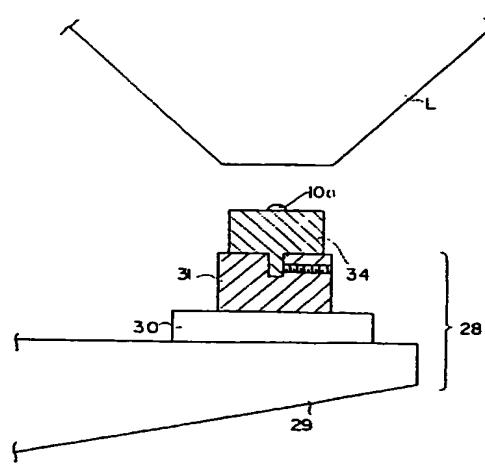
第 1 図



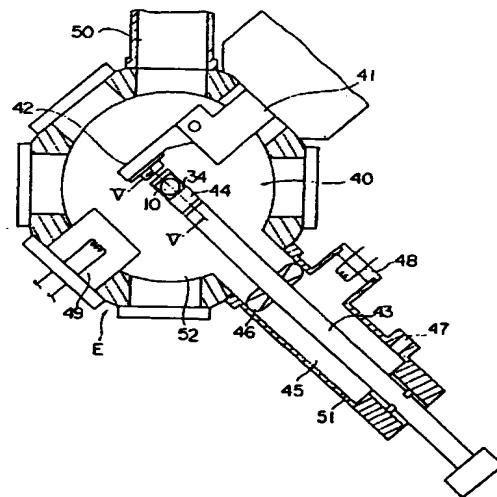
第 2 図



第 3 図

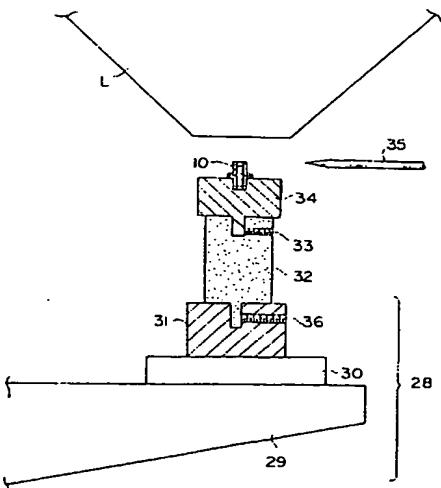


第 4 図

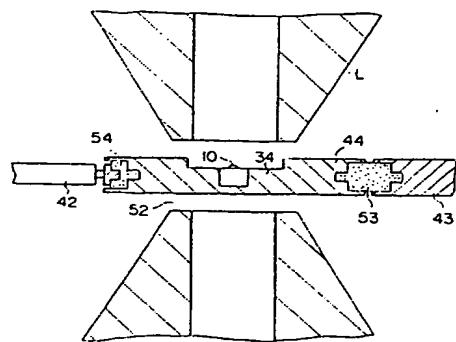


特開昭59-221955(8)

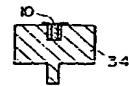
第6図



第5図



第7図



手続補正書(方式)

昭和58年6月23日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1. 事件の表示

昭和58年特許第96660号

2. 発明の名称 迅速クライオステージによる試料観察方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都八王子市曉町1丁目29番19号

氏名(名称) 株式会社 国際精工

4. 代理人 〒105 電話580-8931番

住所 東京都港区虎ノ門1丁目17番3号

氏名(7519) 弁理士 土橋 哲

5. 補正命令の日付(自発)

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明細書及び図面の修正(内容に変更なし)

8. 補正の内容

削紙の通り

特許庁
58.6.23

This Page Blank (uspto)